中国生态农业学报 2016 年 11 月 第 24 卷 第 11 期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Nov. 2016, 24(11): 1539−1546

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.160480

恩诺沙星对厌氧发酵过程中水解酶活性及沼气产量的影响*

张 敏[1] 钱金秋[1] 李忠洲[2] 刘庆玉[1]

(1. 沈阳农业大学工程学院 沈阳 110866; 2. 抚顺出入境检验检疫局 抚顺 113006)

摘 要 兽用抗生素因其具有防病、促生长的作用被广泛应用于畜禽养殖业，而在畜禽粪便发酵生产沼气的过程中，残留在畜禽粪便中的抗生素可能会抑制沼气发酵过程。该文以猪粪和玉米秸秆为原料，采用自行设计的恒温厌氧发酵装置，研究了外源添加恩诺沙星(ENR)对猪粪厌氧发酵过程中水解酶活性及产气量的影响。结果表明，添加 20 mg·kg^{-1}、60 mg·kg^{-1} 和 120 mg·kg^{-1} 恩诺沙星条件下，猪粪厌氧发酵初期不同浓度恩诺沙星对纤维素酶和脲酶活性有显著抑制作用(P<0.05)；厌氧发酵的前 15 d，添加 20 mg·kg^{-1} 恩诺沙星对蔗糖酶活性有一定的激活作用(P<0.05)，添加 60 mg·kg^{-1} 和 120 mg·kg^{-1} 的恩诺沙星对蔗糖酶活性有抑制作用(P<0.05)；猪粪厌氧发酵后期，恩诺沙星对纤维素酶、脲酶和蔗糖酶活性影响不显著(P>0.05)。在发酵产气速率增长期的第 5~11 d 和 21~31 d，添加 20 mg·kg^{-1}、60 mg·kg^{-1} 和 120 mg·kg^{-1} 恩诺沙星对沼气产气速率有明显抑制作用(P<0.05)；而在发酵的第 31 d 后，添加各浓度恩诺沙星对沼气产气速率影响不大。在整个 50 d 的厌氧发酵过程中，与不添加恩诺沙星的对照相比，添加 20 mg·kg^{-1}、60 mg·kg^{-1} 和 120 mg·kg^{-1} 恩诺沙星处理的总产气量分别减少 7.38%、12.08%和 15.77%。可见，恩诺沙星影响了猪粪厌氧发酵过程中水解酶活性和沼气产气速率及产气量，在厌氧发酵不同阶段，恩诺沙星对不同水解酶活性和产气速率影响也不同。该文研究结果可为无害化处理含恩诺沙星的畜禽粪便及提高厌氧发酵效率提供参考。

关键词 畜禽粪便 恩诺沙星 厌氧发酵 水解酶 沼气产量
中图分类号: X705 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3990(2016)11-1539-08

Effect of Enrofloxacin on hydrolytic enzyme activities and biogas production during anaerobic fermentation*

ZHANG Min[1], QIAN Jinqiu[1], LI Zhongzhou[2], LIU Qingyu[1]

(1. College of Engineering, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;
2. Fushun Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fushun 113006, China)

Abstract Veterinary antibiotics are widely used as feed additives in domestic animal rearing either to improve growth performance or to prevent disease infection. A wide range of antibiotics is excreted unchanged in urine and feces of animals, posing potential human and ecological health risks after entering the environment. This is confirmed by the presence of widespread detectable antibiotic concentrations in surface waters and manure. Antibiotics originating in manure from livestock operations are a concern because they remain bioactive. Anaerobic digestion is one of the most promising biotechnologies for the conversion of diverse organic substrates, ranging from high solid feedstocks (animal manure, food waste and municipal solid waste) to municipal and industrial wastewaters and to energy-rich biogas. Most of the biogas plants in China are run on animal manure to reduce biological oxygen demand and to produce biogas. After ingestion by animals, some of the compounds

* 国家自然科学基金项目(31400442)和辽宁省自然科学基金项目(2014027012)资助
张敏，主要从事农业固体废弃物的治理和综合利用教学及研究。E-mail: minzhang412@163.com
收稿日期: 2016−05−27 接受日期: 2016−08−06

* The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31400442) and the Natural Science Foundation of Liaoning Province (2014027012).
Corresponding author, ZHANG Min, E-mail: minzhang412@163.com
Received May 27, 2016; accepted Aug. 6, 2016

are excreted along with the manure which may inhibit biogas process when manure is used as substrate in biogas plants. Most studies on antibiotic inhibition under anaerobic fermentation have focused on animal manure as substrate, showing significant anaerobic fermentation inhibition primarily at higher antibiotic concentrations typically found in manure. An experiment was therefore designed to study the effects of Enrofloxacin (ENR) addition to pig manure on hydrolytic enzyme activities and biogas production in anaerobic fermentation processes with pig manure and corn stalks as raw materials. The results showed that pig manure anaerobic fermentation added with 20 mg·kg^{-1}, 60 mg·kg^{-1} and 120 mg·kg^{-1} ENR inhibited cellulose and urease activities at the initial stage of anaerobic fermentation (P < 0.05). However, the addition of 20 mg·kg^{-1} ENR promoted the activities of sucrose, while the addition of 60 mg·kg^{-1} and 120 mg·kg^{-1} ENR inhibited the activities of sucrase in the first 15 days (P < 0.05). The effects of ENR on cellulase, urease and sucrose activities were not statistically different in the late stage of anaerobic fermentation (P > 0.05). Pig manure-based anaerobic fermentation with 20 mg·kg^{-1}, 60 mg·kg^{-1} and 120 mg·kg^{-1} ENR significantly inhibited gas production rate during 5–11 days and 21–31 days (P < 0.05) of anaerobic fermentation. Compared with control (no ENR application), the gas production rate had no obvious changes in 20 mg·kg^{-1}, 60 mg·kg^{-1} and 120 mg·kg^{-1} ENR treatments after 31 days of anaerobic fermentation. Furthermore, biogas yield decreased by 7.38%, 12.08% and 15.77%, respectively, in 20 mg·kg^{-1}, 60 mg·kg^{-1} and 120 mg·kg^{-1} ENR treatments during anaerobic fermentation for 50 days. It was obvious that ENR influenced hydrolytic enzyme activities, gas production rate and biogas production during anaerobic fermentation. The effects of ENR on different hydrolytic enzyme activities and gas production rate were also different at different stages of anaerobic fermentation. The results provided a reference for harmless disposal of animal manure containing ENR and for improvement of anaerobic fermentation efficiency.
Keywords Livestock manure; Enrofloxacin; Anaerobic fermentation; Hydrolytic enzyme activity; Biogas yield

随着集约化养殖业以及配合饲料工业的发展，兽用抗生素作为饲料添加剂等越来越被广泛应用于畜禽养殖业中。抗生素通过口服或肌肉注射进入动物体内很少被内脏器官吸收利用，约 30%~90%以原药和代谢产物的形式经动物的粪便和尿液进入生态环境中[1−2]。我国近几年兽用抗生素年均消费已达 6 000 t，大规模使用主要集中在经济发达地区，畜禽养殖粪便中的兽用抗生素残留已经达到比较严重的程度[3]。我国 80%的规模化养殖场缺乏必要的污染治理设施，致使大量畜禽粪污直接排入环境，造成环境污染，据预测 2020 年中国畜禽粪便每年排放总量将达 42.44 亿 t[4]。沼气技术是处理畜禽粪便的有效途径，沼气技术的核心是厌氧发酵，它可以利用畜禽粪便、农业秸秆、污泥废水等发酵原料生产沼气，从而实现畜禽粪便的减量化、无害化和资源化利用[5−6]。

但是，在现代畜禽养殖业中，兽用抗生素被广泛应用，导致畜禽粪便中含有较高浓度的兽用抗生素残留[7]。在沼气发酵过程中，残留在畜禽粪便中的兽用抗生素可能会影响畜禽粪便沼气发酵系统的稳定和运行效率，使抗生素成为导致沼气发酵系统不稳定和失败的原因之一[8−9]。孙建平等[10]研究发现金霉素会使猪废水厌氧消化产甲烷速率降低47.4%；潘洪加等[11]研究表明外源添加土霉素对厌氧发酵累积甲烷产量有抑制作用，同对照相比可减少4.6%~9.4%；Álvarez等[12]研究发现土霉素和四环素会抑制猪粪厌氧发酵，可使甲烷产量降低56%~62%。目前有关四环素类抗生素对厌氧发酵影响研究较多[7]，而有关喹诺酮类抗生素对于畜禽粪便厌氧发酵过程中酶活性及沼气产量的影响研究较少。

恩诺沙星(Enrofloxacin)是1987年由德国拜尔公司研制成功并投入使用的第一个动物专用的氟喹诺酮类药物，该药物广泛应用于动物和畜禽养殖业感染性疾病的预防和治疗[13]。近年来我国学者调查发现，氟喹诺酮类抗生素在畜禽粪便中的残留达到了 mg·kg^{-1}级[7]，在对我国8个省、市、自治区规模化养殖畜禽粪便调查中发现，恩诺沙星是主要抗生素污染物，在猪粪中含量高达33.26 mg·kg^{-1}[3]。厌氧发酵生产沼气是在微生物的作用下逐步进行酶促反应的结果，其中水解是整个发酵过程的开始，水解过程的快慢决定着整个发酵过程的速度，而纤维素酶、脲酶等水解酶活性的高低又决定着水解速度，因而水解酶活性与沼气产量存在着直接关系[14−15]。为此，本文研究了添加不同浓度恩诺沙星对猪粪厌氧发酵过程中纤维素酶、脲酶、蔗糖酶活性及沼气产气速率和产气量的影响，为研究恩诺沙星对畜禽粪便厌氧发酵的影响提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 发酵原料

发酵原料玉米秸秆取自沈阳农业大学试验基地，自然风干后剪短至3~5 cm，经粉碎机粉碎成粉末；沼气发酵试验用粪便为采自沈阳农业大学养猪场育成期猪(猪体重40~80 kg)收集的新鲜猪粪。猪采食的

饲料为传统的玉米–豆粕型日粮(自配饲料不含任何抗生素), 饲养期间不使用任何抗生素兽药。接种物沼液取自沈阳农业大学"中国东北寒冷地区综合能源示范基地"猪粪正常沼气发酵后的沼液, 其总固体含量(TS)为8%, 经测定不含恩诺沙星。恩诺沙星购自德国Dr. Ehrenstorfer(纯度97%), 用甲醇稀释溶解。

表 1　试验用厌氧发酵材料的基本性质
Table 1　Basic parameters of experiment materials for anaerobic fermentation

材料 Material	全碳 Total C ($g\cdot kg^{-1}$)	全氮 Total N ($g\cdot kg^{-1}$)	全钾 Total K ($g\cdot kg^{-1}$)	全磷 Total P ($g\cdot kg^{-1}$)	碳氮比 C/N
猪粪 Pig manure	398.65	25.32	15.40	11.86	15.74
玉米秸秆 Corn straw	388.46	6.28	11.83	1.88	61.86

1.2　试验装置

本试验的装置为自制排水集气法简易发酵装置, 主要由2.5 L发酵瓶、2 L集气瓶和2 L排水瓶3部分组成。发酵瓶置于37 ℃恒温水浴锅内, 发酵瓶与集气瓶瓶口用胶塞塞紧, 各部分用乳胶管连接, 所有接口处均用石蜡和凡士林密封。

1.3　试验设计

试验中厌氧发酵的猪粪与秸秆比例为2∶1, 取新鲜猪粪400 g, 碎秸秆200 g加入到发酵瓶中, 根据两种原料含水率以及C/N, 加水调节总固体质量分数为8%, C/N=25∶1, 接种沼液30%(湿重计)。本试验共设置4个处理, 添加恩诺沙星的量(占干猪粪的比例)依次为: 0 $mg\cdot kg^{-1}$ (CK)、20 $mg\cdot kg^{-1}$ (T1)、60 $mg\cdot kg^{-1}$ (T2)和120 $mg\cdot kg^{-1}$(T3), 将恩诺沙星溶液与原料充分混匀装入发酵罐内, 密封在暗处进行发酵, 每个处理重复3次。

1.4　样品采集

分别在沼气发酵的第3 d、6 d、9 d、12 d、15 d、18 d、21 d、24 d、27 d、35 d、45 d和50 d对沼气发酵沼渣沼液混合物进行采样(采样前晃动发酵罐混匀), 4 ℃冰箱冷藏, 用于酶活性的测定。从试验启动的第2 d起, 每天定时记录日产气量(产气速率), 采用排水法收集沼气, 共持续50 d。

1.5　样品测定

1.5.1　酶活性的测定

水解酶活性测定参照关松荫[16]的方法。纤维素水解酶活性采用比色法测定, 以 24 h 后 1 g 样品中生成葡萄糖的质量表示($mg\cdot g^{-1}\cdot d^{-1}$), 脲酶活性采用比色法测定, 以 24 h 后 1 g 样品中生成 NH_3-N 的质量表示($mg\cdot g^{-1}\cdot d^{-1}$), 蔗糖酶活性采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定, 以 24 h 后 1 g 样品中生成葡萄糖的质量表示($mg\cdot g^{-1}\cdot d^{-1}$)。

1.5.2　恩诺沙星浓度的测定

样品恩诺沙星含量测定参照张敏等[17]的方法利用高效液相色谱–荧光检测进行测定。

1.6　数据处理

数据采用Microsoft Excel 2003进行处理和制图。

2　结果与分析

2.1　不同浓度恩诺沙星对厌氧发酵过程中纤维素酶活性的影响

纤维素是植物性发酵原料的主要成分, 在厌氧发酵过程中, 可在纤维素酶作用下水解为纤维二糖, 进而水解为葡萄糖, 因此纤维素酶活性的变化可以反映发酵过程中碳素物质的降解情况[18]。由图1可以看出, 在厌氧发酵过程中纤维素酶活性先升高后降低。在第3 d, 添加恩诺沙星处理纤维素酶活性显著低于CK对照($P<0.01$), CK和T1处理在厌氧发酵第9 d后纤维素酶活性差异不显著($P>0.05$), 在第21 d纤维素酶活性达到最高值, 分别为6.73 $mg\cdot g^{-1}\cdot d^{-1}$和6.88 $mg\cdot g^{-1}\cdot d^{-1}$。在发酵前21 d T2和T3处理的纤维素酶活性显著低于CK和T1处理($P<0.05$), 表明较高浓度水平的恩诺沙星抑制了厌氧发酵过程中的纤维素酶活性, 而T2和T3处理纤维素酶活性于第27 d达到最高值, 分别为5.41 $mg\cdot g^{-1}\cdot d^{-1}$和4.32 $mg\cdot g^{-1}\cdot d^{-1}$, 表明添加中高浓度外源恩诺沙星不仅对纤维素酶活性的最大值具有抑制作用, 并且延缓了纤维素酶活性最大值的出现时间。而发酵35 d后, T2和T3处理的纤维素酶活性与CK和T1处理差异不显著($P>0.05$)。由于厌氧发酵对抗生素具有降解和去除作用[19–20], 可能是随着恩诺沙星在厌氧发酵过程的不断降解, 使得其对纤维素酶的活性抑制有所降低。由以上分析可知, 添加外源恩诺沙星使厌氧发酵过程中纤维素酶活性变化趋势发生很大变异, 可能是添加恩诺沙星使发酵液中微生物数量和群落结构发生变化, 发酵液中水解纤维素相关类群微生物的生长受到影响。

2.2　不同浓度恩诺沙星对厌氧发酵过程中脲酶活性的影响

脲酶是氮素循环的一种关键性酶, 能促进含氮有机物的水解, 测定脲酶活性对于了解沼气发酵液中蛋白质等含氮有机物的分解具有重要意义[21]。由

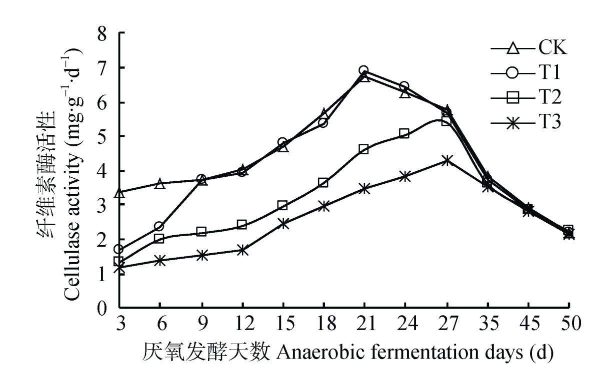


图 1 不同恩诺沙星添加量处理下厌氧发酵过程中纤维素酶活性的变化

Fig. 1 Variation of cellulase activity during anaerobic fermentation under different addition amounts of Enrofloxacin

CK: 不添加恩诺沙星; T1: 添加20 mg·kg^{-1}恩诺沙星; T2: 添加60 mg·kg^{-1}恩诺沙星; T3: 添加120 mg·kg^{-1}恩诺沙星。下同。CK: no adding Enrofloxacin; T1: adding 20 mg·kg^{-1} Enrofloxacin; T2: adding 60 mg·kg^{-1} Enrofloxacin; T3: adding 120 mg·kg^{-1} Enrofloxacin. The same below.

图2可以看出, 添加恩诺沙星后的第3 d, T1、T2和T3各处理脲酶活性均受到不同程度的抑制, 显著低于CK(P<0.01), T1、T2和T3各处理对脲酶活性的抑制率分别为31.5%、40.3%和57.7%。CK处理的脲酶活性在厌氧发酵的第9 d达到最大值8.85 mg·g^{-1}·d^{-1}, 而T1、T2和T3处理在厌氧发酵的第12 d达到最大值, 分别为6.38 mg·g^{-1}·d^{-1}、5.62 mg·g^{-1}·d^{-1}和4.87 mg·g^{-1}·d^{-1}, 这可能是由于厌氧发酵初期一定浓度的恩诺沙星对微生物产生抑制作用, 导致微生物的密度降低, 进而分泌脲酶比CK要少。在厌氧发酵第3~18 d, T1、T2和T3处理脲酶活性显著低于CK处理(P<0.05); 第24 d开始, T1和T2处理脲酶活性与CK处理差异不显著(P>0.05); 第27 d开始, 各处理之间脲酶活性差异均不显著(P>0.05)。可能是随着恩诺沙星在厌氧发酵过程中的沉积和降解, 其对微生物抑制作用减弱, 各处理的脲酶活性逐渐恢复到对照水平。

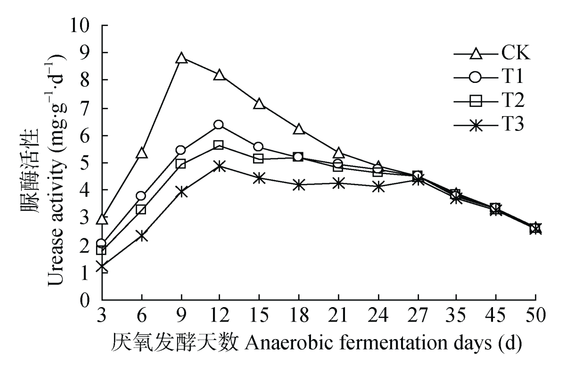


图 2 不同恩诺沙星添加量处理下厌氧发酵过程中脲酶活性的变化

Fig. 2 Variation of urease activity during anaerobic fermentation under different addition amounts of Enrofloxacin

2.3 不同浓度恩诺沙星对厌氧发酵过程中蔗糖酶活性的影响

蔗糖酶是一种重要的水解酶, 可以把蔗糖水解为葡萄糖和果糖, 以满足微生物生长发育中对碳源和能源的需求[21]。由图3可以看出, CK、T1、T2和T3处理厌氧发酵液中蔗糖酶活性均是先升高后降低。CK和T1处理蔗糖酶活性在厌氧发酵的第12 d达到最大值, 分别为56.82 mg·g^{-1}·d^{-1}和63.17 mg·g^{-1}·d^{-1}; T2和T3处理蔗糖酶活性在第15 d分别达到了52.68 mg·g^{-1}·d^{-1}和49.47 mg·g^{-1}·d^{-1}的峰值。可见, 添加中高浓度的恩诺沙星推迟了蔗糖酶活性峰值到来的时间。从图中可以看出, 在第3~15 d, T1处理蔗糖酶活性显著高于CK处理(P<0.05), 表明低浓度的恩诺沙星对厌氧发酵液中蔗糖酶活性有促进作用; 而T2和T3处理蔗糖酶活性显著低于CK处理(P<0.05), 表明高浓度的恩诺沙星对厌氧发酵液中蔗糖酶活性有抑制作用。第21 d后各处理之间蔗糖酶活性差异不显著(P>0.05), 可能是由于随着恩诺沙星的不断降解而对蔗糖酶活性的影响逐渐减弱, 同时蔗糖酶活性本身也在减弱, 导致差异不显著。

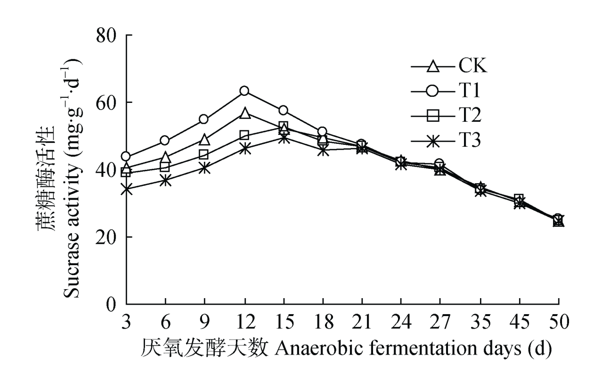


图 3 不同恩诺沙星添加量处理下厌氧发酵过程中蔗糖酶活性的变化

Fig. 3 Variation of sucrase activity during anaerobic fermentation under different addition amount of Enrofloxacin

2.4 恩诺沙星对沼气产气速率及产气量的影响

产气速率是厌氧发酵条件下发酵原料产生沼气的速度, 是衡量原料发酵分解好坏的主要指标之一。从图 4 可以看出, 在发酵产气的过程中, CK、T1、T2 和 T3 处理的沼气产气速率均呈现先增后减的趋势。这可能是因为试验采用猪粪加秸秆的混合式发酵方式, 试验开始时发酵原料既有富氮原料, 又有富碳原料, 富碳原料分解较慢; 同时厌氧微生物对环境有一个逐渐适应的过程, 随着对环境的逐渐适应, 其活性越来越大, 所以开始时, 秸秆等富碳原料未被分解, 产气量较少, 后富碳原料被分解, 产气量也随之逐渐增加, 之后由于原料中大部分有机

物被分解, 产气量又逐渐减少。CK 和 T1 处理在发酵的第 11 d 日产气速率达到峰值, 分别为 1 124 mL·d^{-1}和 918 mL·d^{-1}, 随后开始下降; T2 和 T3 处理在第 16 d 达到峰值, 分别为 875 mL·d^{-1}和 852 mL·d^{-1}, 可见添加中高浓度恩诺沙星推迟了产气高峰到来的时间; 所有处理在第 1 个产气高峰后, 发酵液进行充分搅拌, CK 处理在发酵的第 28 d 达到最高产气速率, 为 1 536 mL·d^{-1}, T1、T2 和 T3 处理在发酵的第 30 d 达到最高产气速率, 分别为 1 386 mL·d^{-1}、1 378 mL·d^{-1}和 1 342 mL·d^{-1}, 之后各处理发酵逐渐平缓下降。在发酵产气速率增长期的第 5~11 d 和 21~31d, CK 处理产气速率显著高于 T1、T2 和 T3 处理(P<0.05), T3 处理产气速率最低。结果表明, 添加恩诺沙星对厌氧发酵产气速率有明显的抑制作用, 而在发酵的第 31 d 后, 各处理之间产气速率差异不显著(P>0.05), 可能是由于随着发酵进行恩诺沙星也不断降解, 对厌氧发酵产气速率的抑制作用也在减弱。

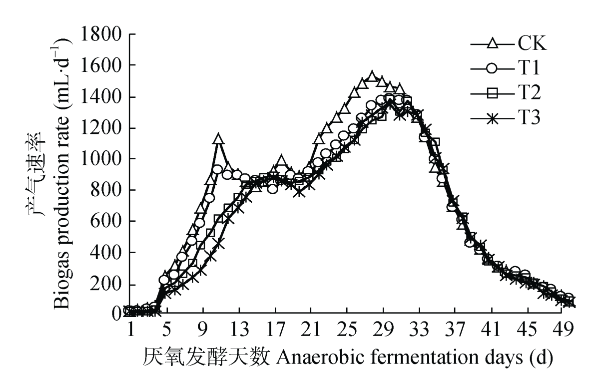


图 4　不同恩诺沙星添加量处理对厌氧发酵产气速率的影响

Fig. 4　Effects of different addition amounts of Enrofloxacin on biogas production rate during anaerobic fermentation

累积产气量指厌氧发酵过程中有机物质产气的总量, 是衡量厌氧发酵系统与工艺优劣的重要参数。在整个50 d的厌氧发酵过程中, CK、T1、T2和T3的总产气量分别为36 988 mL、34 260 mL、32 519 mL和31 156 mL(图5), 可见随着添加恩诺沙星浓度的增加, 总产气量下降, 同CK对照相比T1、T2和T3各处理产气量分别减少7.38%、12.08%和15.77%。

3　结论与讨论

畜禽粪便的厌氧发酵过程, 其实是各种各样的酶主导的生物化学反应过程, 而这些酶的活性通常会受到各种环境因素的影响, 抗生素会通过抑制酶的活性进而影响厌氧发酵的效能。陈智学等[22]研究发现在堆肥的第1 d土霉素对纤维素酶活性有抑制作用, 第3 d土霉素对纤维素酶活性起促进作用, 在

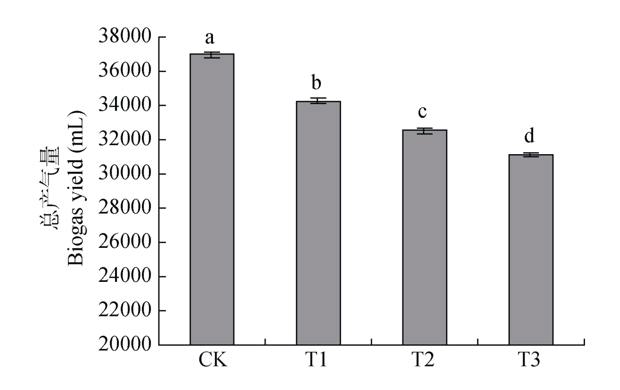


图 5　不同恩诺沙星添加量处理对厌氧发酵产气量的影响

Fig. 5　Effects of different addition amounts of Enrofloxacin on biogas yield of anaerobic fermentation

4~30 d高浓度土霉素对纤维素酶活性有抑制作用; 在堆肥的前期, 土霉素刺激脲酶活性, 随着堆肥时间的延长, 土霉素对脲酶活性由刺激变为抑制作用。潘洪加等[11]研究发现厌氧发酵初期土霉素对脲酶活性有一定的促进作用, 在厌氧发酵后期, 土霉素对脲酶活性转变为抑制作用。张凯煜等[23]研究发现在堆肥前期, 土霉素和磺胺二甲嘧啶对脲酶活性无显著影响, 而在堆肥后期, 抗生素对脲酶活性有抑制作用。金彩霞等[24]研究表明第11 d之前磺胺间甲氧嘧啶对土壤脲酶活性表现为抑制作用, 至第15 d之后磺胺间甲氧嘧啶对脲酶活性影响逐渐恢复至对照水平, 大都表现为微弱的激活效应, 而对土壤蔗糖酶活性的影响表现出“激活–抑制–激活”的规律。姚志鹏等[25]研究发现土霉素对土壤蔗糖酶活性在培养前期具有轻微的抑制作用, 但培养后期具有较强的抑制作用; 而对土壤脲酶活性的影响则相反, 在培养第1 d 100 mg·kg^{-1}处理对脲酶具有显著的刺激作用, 以后土霉素对脲酶活性影响不明显。国彬等[26]研究发现磺胺类兽药可显著抑制土壤蔗糖酶的活性; 土壤脲酶活性的影响表现为, 培养前期低浓度时激活, 高浓度时抑制, 培养后期低、高浓度时均抑制。本研究结果表明, 在厌氧发酵初期, 不同浓度的恩诺沙星对纤维素酶和脲酶活性有抑制作用; 在厌氧发酵的前15 d, 添加20 mg·kg^{-1}恩诺沙星对蔗糖酶活性有一定的激活作用, 添加60 mg·kg^{-1}和120 mg·kg^{-1}的恩诺沙星对蔗糖酶活性有抑制作用; 在沼气发酵后期, 随着恩诺沙星在发酵过程中的不断降解, 其对纤维素酶、脲酶和蔗糖酶活性影响不大。本研究发现恩诺沙星在厌氧发酵不同时期对纤维素酶、脲酶和蔗糖酶活性的影响不同, 可能因为抗生素影响各类水解酶活性机制不同, 也可能与添加抗生素的浓度有关。同时, 比较本研究和前人研究文献可以发现, 国内外学者研究结果之间存在一

定差异，分析原因可能与研究选择的抗生素种类、微生物生长环境等有关。

沼气产气速率及产气量是衡量厌氧发酵系统优劣的重要指标。Beneragama等[27]研究发现土霉素和头孢唑啉对牛粪高温沼气发酵甲烷产量有明显的抑制作用，可使甲烷产量降低32%。据Massé等[28]发现盘尼西林和四环素可使猪废水厌氧消化的产甲烷速率降低35%和25%。Shi等[29]研究发现四环素和磺胺甲氧嘧啶推迟了猪粪沼气发酵甲烷产生时间，20 d内甲烷的累积产生量比对照明显降低。Mitchell等[30]研究发现氨苄青霉素在厌氧发酵初期阶段会抑制沼气产气速率，泰乐菌素可降低沼气产气量10%~38%。本研究结果表明，在发酵产气速率增长期的第5~11 d和22~28 d，添加20 mg·kg^{-1}、60 mg·kg^{-1}和120 mg·kg^{-1}的恩诺沙星对沼气产气速率有明显的抑制作用；而在发酵的第31 d后，添加各浓度恩诺沙星对沼气产气速率影响不大。在整个50 d的厌氧发酵过程中，同CK相比添加20 mg·kg^{-1}、60 mg·kg^{-1}和120 mg·kg^{-1}的恩诺沙星处理总产气量分别减少7.38%、12.08%和15.77%，该研究与前人的研究结论基本一致。已有文献证明水解酶活性与沼气产量存在着直接关系[14−15]，本试验也表明，沼气发酵过程中，纤维素酶、脲酶和蔗糖酶活性均出现在产气峰值的附近，水解酶活性与沼气产气速率的变化曲线相似。

综上所述，恩诺沙星影响了厌氧发酵过程中水解酶活性和沼气产气速率及产气量，在厌氧发酵不同阶段，恩诺沙星对不同水解酶活性和产气速率影响也不同。在厌氧发酵初期，恩诺沙星对纤维素酶和脲酶活性有抑制作用，且随药物浓度的增高而影响加大，低浓度恩诺沙星对蔗糖酶活性有一定的激活作用，中高浓度恩诺沙星对蔗糖酶活性有抑制作用；在沼气发酵后期，恩诺沙星对纤维素酶、脲酶和蔗糖酶活性无明显影响。在厌氧发酵产气速率增长期(第 5~11 d 和 22~28 d)，恩诺沙星对沼气产气速率有明显抑制作用，在产气下降期(31 d 后)对沼气产气速率影响不大；在整个 50 d 的厌氧发酵过程中，恩诺沙星降低了厌氧发酵沼气总产气量，并随着浓度增长而影响加大，恩诺沙星影响下厌氧发酵水解酶活性与沼气产气量呈正相关。沼气发酵这一厌氧生物降解过程极其复杂，沼气发酵是涉及多菌群相互作用的非线性复杂系统，是复杂微生物区系相互制约的动态平衡过程，各种微生物的活动不仅相互作用、相互依赖，而且互为制约，共同影响沼气的产量。沼气发酵过程中微生物群落结构及水解酶活性变化是影响沼气发酵产气效率的关键因素[31−32]。因此，在今后还应加强抗生素对厌氧发酵过程中微生物菌群数量、多样性及其与水解酶活性和沼气产量之间的协同性研究，进一步明确抗生素影响厌氧发酵的机制，为优化畜禽粪便厌氧发酵参数提供理论依据。

参考文献 References

[1] Sarmah A K, Meyer M T, Boxall A B A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment[J]. Chemosphere, 2006, 65(5): 725–759

[2] Boxall A B, Fogg L A, Blackwel P A, et al. Veterinary medicines in the environment[M]//Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. New York: Springer, 2004, 180: 1–91

[3] Zhao L, Dong Y H, Wang H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China[J]. Science of the Total Environment, 2010, 408(5): 1069–1075

[4] 刘辉，王凌云，刘忠珍，等. 我国畜禽粪便污染现状与治理对策[J]. 广东农业科学, 2010, 37(6): 213–216
Liu H, Wang L Y, Liu Z Z, et al. Pollution condition and cure countermeasures of excrements from livestock and poultry[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2010, 37(6): 213–216

[5] Zhang P D, Yang Y L, Tian Y S, et al. Bioenergy industries development in China: Dilemma and solution[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2009, 13(9): 2571–2579

[6] 史金才，廖新俤，吴银宝. 4 种畜禽粪便厌氧发酵产甲烷特性研究[J]. 中国生态农业学报, 2010, 18(3): 632−636
Shi J C, Liao X D, Wu Y B. Methane generation during anaerobic fermentation of four livestock slurries[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2010, 18(3): 632−636

[7] 刘锋，廖德润，李可，等. 畜禽养殖基地磺胺类喹诺酮类和大环内酯类抗生素污染特征[J]. 农业环境科学学报，2013, 32(4): 847–853
Liu F, Liao D R, Li K, et al. Pollution characteristics of the sulfonamides, quinolones and macrolides in the samples collected from livestock and poultry feedlots[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(4): 847–853

[8] 孙建平，郑平，胡宝兰，等. 抗生素对猪场废水厌氧生物处理的影响[J]. 太阳能学报, 2009, 30(6): 824–828
Sun J P, Zheng P, Hu B L, et al. Effect of antibiotics on anaerobic digestion of piggery wastewater[J]. Acta Energiae Solaris Sinica, 2009, 30(6): 824–828

[9] Chen Y, Cheng J J, Creamer K S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(10): 4044–4064

[10] 孙建平，郑平，胡宝兰. 金霉素对猪场废水厌氧消化抑制作用[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2010, 42(4): 652–655
Sun J P, Zheng P, Hu B L. Inhibitory effect of aureomycin on

anaerobic digestion of piggery wastewater[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2010, 42(4): 652–655
[11] 潘洪加, 谷洁, 史龙翔, 等. 土霉素对厌氧发酵中酶活性和甲烷产量的影响[J]. 环境科学学报, 2015, 35(7): 2217–2223
Pan H J, Gu J, Shi L X, et al. Effects of OTC concentration on methane production and enzyme activities during anaerobic fermentation[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2015, 35(7): 2217–2223
[12] Álvarez J A, Otero L, Lema J M, et al. The effect and fate of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(22): 8581–8586
[13] 符博敏, 岳林, 冯丹, 等. 恩诺沙星与 Cu 复合污染对白菜和西红柿根及芽伸长的抑制作用[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(5): 157–163
Fu B M, Yue L, Feng D, et al. Inhibitory effect of combined pollution of enrofloxacin and Cu on root and shoot elongation of cabbage and tomato[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(5): 157–163
[14] 牛俊玲, 梁丽珍, 刘蕾, 等. 温度对麦秸混合物料厌氧干发酵中糖类水解酶活性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(10): 1271–1276
Niu J L, Liang L Z, Liu L, et al. Effect of temperature on carbohydrate hydrolase activity during dry anaerobic fermentation of mixed wheat straw[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2013, 21(10): 1271–1276
[15] 张无敌, 宋洪川, 尹芳, 等. 牛粪在沼气发酵过程中的水解酶酶活变化研究[J]. 能源工程, 2003(6): 21–23
Zhang W D, Song H C, Yin F, et al. Correlation study between biogas output & hydrolase activity during the biogas fermentation of cattle manure[J]. Energy Engineering, 2003(6): 21–23
[16] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 260–339
Guan S Y. Soil Enzyme and its Research Methods[M]. Beijing: Agricultural Press, 1986: 260–339
[17] 张敏, 刘庆玉, 敖永华. 高效液相色谱–荧光检测畜禽粪污中四种氟喹诺酮类抗生素残留[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(3): 602–604
Zhang M, Liu Q Y, Ao Y H. Determination of four kinds of fluoroquinolones antibiotics residues in livesotck feces by high performance liquid chromatography-fluorescence detection[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(3): 602–604
[18] 牛俊玲, 秦莉, 郑宾国. 鼠李糖脂对餐厨垃圾厌氧发酵过程中水解酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(8): 1589–1594
Niu J L, Qin L, Zheng B G. Effect of rhamnolipid on hydrolase activity during anaerobic digestion of kitchen residues[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2015, 34(8): 1589–1594
[19] 陈永山, 章海波, 骆永明, 等. 典型规模化养猪场废水中兽用抗生素污染特征与去除效率研究[J]. 环境科学学报, 2010, 30(11): 2205–2212
Chen Y S, Zhang H B, Luo Y M, et al. A preliminary study on the occurrence and dissipation of antibiotics in swine wastewater[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2010, 30(11): 2205–2212
[20] 童子林, 刘元璐, 胡真虎, 等. 四环素类抗生素污染畜禽粪便的厌氧消化特征[J]. 环境科学, 2012, 33(3): 1028–1032
Tong Z L, Liu Y L, Hu Z H, et al. Anaerobic digestion of animal manure contaminated by tetracyclines[J]. Environmental Science, 2012, 33(3): 1028–1032
[21] 陈琳, 谷洁, 高华, 等. Cu 对厌氧发酵中水解酶活性及沼气产量的影响[J]. 农业工程学报, 2012, 28(9): 202–207
Chen L, Gu J, Gao H, et al. Effects of Cu on hydrolytic enzyme activities and biogas production during anaerobic fermentation[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2012, 28(9): 202–207
[22] 陈智学, 谷洁, 高华, 等. 土霉素对堆肥过程中酶活性和微生物群落代谢的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(21): 6957–6966
Chen Z X, Gu J, Gao H, et al. Effect of oxytetraeyeline (OTC) on the activities of enzyme and microbial community metabolic profiles in composting[J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(21): 6957–6966
[23] 张凯煜, 谷洁, 赵听, 等. 土霉素和磺胺二甲嘧啶对堆肥过程中酶活性及微生物群落功能多样性的影响[J]. 环境科学学报, 2015, 35(12): 3927–3936
Zhang K Y, Gu J, Zhao T, et al. Effects of OTC and SM_2 on the enzyme activities and the functional diversity of microbial community during pig manure composting[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2015, 35(12): 3927–3936
[24] 金彩霞, 刘军军, 陈秋颖, 等. 兽药磺胺间甲氧嘧啶对土壤呼吸及酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(2): 314–318
Jin C X, Liu J J, Chen Q Y, et al. Effects of sulfamonomethoxine on soil respiration and enzyme activity[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(2): 314–318
[25] 姚志鹏, 李兆君, 梁永超, 等. 土壤酶活性对土壤中土霉素的动态响应[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(3): 696–700
Yao Z P, Li Z J, Liang Y C, et al. Dynamic responses of soil enzymatic activities to oxytetracycline in soil[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2009, 15(3): 696–700
[26] 国彬, 姚丽贤, 刘忠珍, 等. 磺胺类兽药对土壤酶活性的影响[J]. 生态环境学报, 2011, 20(5): 970–974
Guo B, Yao L X, Liu Z Z, et al. Impact of sulfonamide veterinary drugs on soil enzymes activity[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2011, 20(5): 970–974
[27] Beneragama N, Lateef S A, Iwasaki M, et al. The combined effect of cefazolin and oxytertracycline on biogas production from thermophilic anaerobic digestion of dairy manure[J]. Bioresource Technology, 2013, 133: 23–30
[28] Massé D I, Lu D, Masse L, et al. Effect of antibiotics on psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors[J]. Bioresource Technology, 2000, 75(3): 205–211

[29] Shi J C, Liao X D, Wu Y B, et al. Effect of antibiotics on methane arising from anaerobic digestion of pig manure[J]. Animal Feed Science and Technology, 2011, 166/167: 457–463
[30] Mitchell S M, Ullman J L, Teel A L, et al. The effects of the antibiotics ampicillin, florfenicol, sulfamethazine, and tylosin on biogas production and their degradation efficiency during anaerobic digestion[J]. Bioresource Technology, 2013, 149: 244–252
[31] Zwirglmaier K, Ludwig W, Schleifer K H. Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization-ring-fish[J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(1): 89–96
[32] 崔晓龙, 张无敌, 王永霞, 等. 沼气发酵生态系统的微生物群落动态研究进展[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2013, 35(3): 399–406
Cui X L, Zhang W D, Wang Y X, et al. Research advances in the microbial community dynamics of biogas fermentation ecosystems[J]. Journal of Yunnan University: Natural Sciences Edition, 2013, 35(3): 399–406